

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.

⑯ 日本国特許庁 (JP)  
 ⑰ 公開特許公報 (A)

⑪ 特許出願公開  
 昭56-51992

⑤ Int. Cl.<sup>3</sup>  
 C 12 P 17/06  
 7/62

識別記号  
 庁内整理番号  
 7115-4B  
 6760-4B

④公開 昭和56年(1981)5月9日  
 発明の数 1  
 審査請求 未請求

(全3頁)

⑤ 生理活性物質ML-236Bの製造法

⑥ 特願 昭54-127563  
 ⑦ 出願 昭54(1979)10月3日  
 ⑧ 発明者 吉川博治  
 東京都品川区広町1丁目2番58  
 号三共株式会社醸酵研究所内  
 ⑨ 発明者 岩藤誠吾  
 東京都品川区広町1丁目2番58

号三共株式会社醸酵研究所内

⑩ 発明者 寺尾道也  
 東京都品川区広町1丁目2番58  
 号三共株式会社醸酵研究所内  
 ⑪ 出願人 三共株式会社  
 東京都中央区日本橋本町3丁目  
 1番地の6  
 ⑫ 代理人 弁理士 横出庄治

明細書

1. 発明の名称

生理活性物質ML-236Bの製造法

2. 等許請求の範囲

ML-236AまたはML-236CよりML-236Bを生成する能力を有するペニシリウム属に属する微生物の作用により、ML-236AまたはML-236CよりML-236Bを生成せしめるこれを特徴とするML-236Bの製造法。

3. 発明の詳細な説明

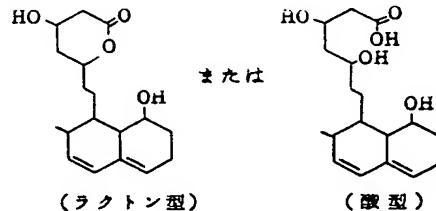
本発明は生理活性物質ML-236Bの微生物変換による製造法に関するものである。

ML-236Bはコレステロール生合成阻害作用を有する生理活性物質で、動脈硬化、高脂血症など体内におけるコレステロールの蓄積が原因の一つである疾患の予防あるいは治療用の医薬として有用である。ML-236A、ML-236Cもまた同様の作用を有するが、そのコレステロール生合成の50%阻害濃度はML-236Bが

0.01  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、ML-236Aが0.18  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、ML-236Cが0.08  $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、ML-236Bが最も有効である [J. Antibiotics 29 1347, (1976)]。

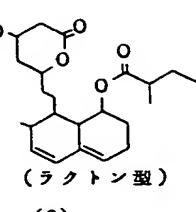
これらの物質は全て既知物質であり次の化学構造を有する。

ML-236A



なお以下のML-236BおよびML-236Cにおいても同様にラクトン型および酸型が存在する。ここではラクトン型のみを示す。

ML-236B

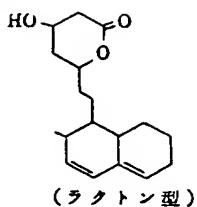


(ラクトン型)

(2)

(1)

ML-236C



本発明者らはML-236AまたはML-236CからML-236Bへの変換について種々研究した結果、ペニシリウム属に属する微生物により、ML-236AあるいはML-236CよりML-236Bに変換しうることを見出した。

本発明において用いられる微生物としては、ML-236AまたはML-236CをML-236Bに変換しうる能力を有するペニシリウム属に属する微生物が用いられるが、本発明者らが特に有効であると認める菌株は、例えばペニシリウム・ナトリヌムSANK 18767であり、本菌株は微生物研に寄託されており、その寄託番号は微生物寄第2609号である。

(3)

る蛋白区分の精製物、さらに上記菌体または菌体処理物の固定化物等いずれもが使用できる。

これら微生物の菌体またはその処理物をML-236AまたはML-236Cに作用せしめるには、水性反応液中にこれらを溶解または懸濁し、好ましくは温度を10~35°C、pHを3~9に保てばよい。この間必要ならば溶液または懸濁液を適宜攪拌する。かくして反応液中にはML-236Bが生成、蓄積される。

反応液よりML-236Bを採取する方法は通常よく行われる方法、すなわち有機溶剤による抽出、種々の吸着剤を用いる等の方法で行ないうる。生成したML-236Bの同定、定量には高速液体クロマトグラフィーまたは薄層クロマトグラフィーを用いた。

## 実施例 1

グリセリン6%, グルコース3%, ポリペプトンS(大五)1.5%, ベプトン(極東)0.8%, NaNO<sub>3</sub> 0.2%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01%を含み、pH 6.5に調整した液体培地を500mL容三角フラスコ

上記以外のペニシリウム属菌でもML-236AあるいはML-236CをML-236Bに変換し得る能力を有するものであれば、その変種、変異株を問わず使用し得ることはいうまでもない。

これらの微生物をML-236AまたはML-236Cに作用せしめる方法は、水性反応液中においてこれらの微生物菌体またはその処理物を上記の原料に接触せしめればよい。

これらの微生物菌体を得る方法は、炭素源、窒素源、無機イオンおよび更に必要ならばビタミン等の有機微量栄養素を含有する通常の培地を用いて培養すればよい。培養方法についても特別な方法を要せず、従来知られている方法が適宜採用される。菌体としては上記の方法で得られた培養液そのまゝ、あるいは洗浄菌体が使用できる。菌体処理物としてはアセトン乾燥菌体、菌体の摩擦物、菌体の超音波処理物、界面活性剤またはトルエン等で処理した菌体、リゾチーム等の酵素で処理した菌体、塩析等で分離した菌体の蛋白区分、本反応の酵素活性を有す

(4)

に80mL入れ殺菌した。この培地にペニシリウム・ナトリヌムSANK 18767を接種し、24°C、200 rpmで45時間、回転振盪培養した。得られた培養液より菌体を集め、0.05Mリン酸緩衝液(pH 6.0)で洗浄後、同緩衝液に懸濁した。上記菌体懸濁液9mL(15mL乾燥重量/mL)をグリセリン600mL、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 24.6g、ML-236A 18%を含む反応液1mLに加え100mL容三角フラスコにて24°C 74時間、回転振盪を行なながら反応せしめた。最終反応液中に生成したML-236Bはシリカゲルプレート(メルク社製)を用いた薄層クロマトグラフィーにて分離し、二波長クロマトスキャナー(島津製作所CS-900)を用いて定量した。コントロール(ML-236A無添加)ではML-236Bが510μg/mL生成していたのに対し、ML-236A添加の場合には1030μg/mLのML-236Bが生成し、9.65μg/mLのML-236Aが残存していた。この場合のML-236AからML-236Bへの変換率は63%であつた。

(5)

(6)

## 実施例 2

実施例 1 に示した方法により、ベニシリウム・トリヌム SANK 18767 の菌体懸濁液を得た。菌体懸濁液 9 ml (10 mg 乾燥重量/ml) をラクトース 500 mg,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  24.6 mg, ML-236C 9 mg を含む反応液 1 ml に加え、100 ml 容三角フラスコにて 24°C, 70 時間回転振盪を行ながる反応せしめた。最終反応液中の ML-236B の定量を二波長クロマトスキャナーを用いて行つたところ、コントロール (ML-236C 無添加) では  $210 \mu g/ml$  の ML-236B が生成したのに対し、ML-236C を添加した場合には  $400 \mu g/ml$  の ML-236B と  $180 \mu g/ml$  の ML-236A が生成していた。この場合、ML-236C から ML-236B への変換率は 24.1%, ML-236C から ML-236A への変換率は 20.0% であつた。

特許出願人 三共株式会社  
代理人弁理士 横出 庄治

(7)